

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-049332

(43)Date of publication of application : 21.02.1995

(51)Int.Cl.

G01N 27/416

(21)Application number : 05-192452

(71)Applicant : A & D CO LTD

(22)Date of filing : 03.08.1993

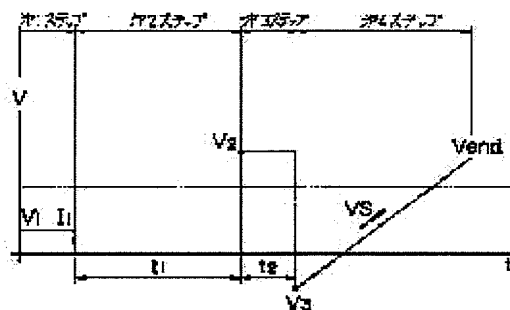
(72)Inventor : NOZOE YOSHITERU

(54) VOLTAGE APPLICATION METHOD OF ENZYME ELECTRODE

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a voltage application method which enables the expanding of a measurable range of an enzyme electrode.

CONSTITUTION: Voltage application method consists of the first-fourth steps. At the first step, contact of a specimen with an enzyme electrode is detected. At the second step, a working pole is kept for a fixed time t_1 at the first potential at which no current flows through a working electrode. At the third step, the second potential V_2 exceeding a detection potential of hydrogenperoxide is applied to the working pole for a specified time t_2 and thereafter, is lowered to the third potential V_3 below a zero potential. At the fourth step, in the detection of a substance to be measured by sweeping the working pole to the fourth potential V_{end} exceeding the detection potential of hydrogen peroxide at a fixed speed V_s from the third potential V_3 , any of a peak value of current, a current value at a potential separated by a fixed potential from the peak value and a current value at a specified potential is determined during the sweeping and a conversion is performed from a calibration curve determined previously.



(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-49332

(43)公開日 平成7年(1995)2月21日

(51)Int.Cl.⁸
G 0 1 N 27/416

識別記号 庁内整理番号
7363-2 J

F I
G 0 1 N 27/ 46 3 3 6 B

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 7 頁)

(21)出願番号 特願平5-192452

(22)出願日 平成5年(1993)8月3日

(71)出願人 000127570

株式会社エー・アンド・デイ
東京都豊島区東池袋3丁目23番14号

(72)発明者 野添 由照

埼玉県北本市朝日1丁目243番地 株式会
社エー・アンド・デイ開発・技術センター
内

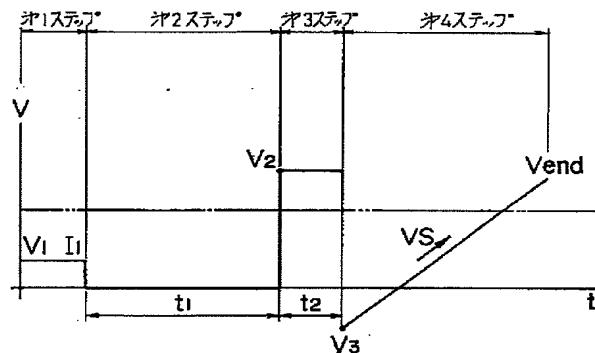
(74)代理人 弁理士 八木 秀人 (外3名)

(54)【発明の名称】 酵素電極の電圧印加方法

(57)【要約】

【目的】 酵素電極の測定可能な範囲が拡大できる電圧の印加方法の提供。

【構成】 電圧印加方法は、第1ステップ～第4ステップから構成されている。第1ステップは、酵素電極に検体が接触したことを検出するステップである。第2ステップは、作用極に電流が流れない第1の電位に一定時間 t_1 保持するステップである。第3ステップは、作用極に、過酸化水素検知電位以上の第2の電位 V_2 を所定時間 t_2 印加し、その後に零電位以下の第3の電位 V_3 に低下させる。第4ステップは、作用極に、第3の電位 V_3 から一定の速度 v_s で過酸化水素検知電位以上の第4の電位 V_{end} まで掃引する被測定物質の検出は、掃引している間に、電流のピーク値、そのピーク値から一定電位隔たった電位での電流値、特定電位での電流値のいずれかを求め、予め求めておいた検量線から換算する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 作用極と参照極と対極とを有する過酸化水素型の酵素電極に検体を滴下して、前記電極間に電圧を印加する方法において、前記電極に検体が接触したことを検出する第 1 ステップと、この第 1 ステップの後に、前記作用極に電流が流れない第 1 の電位に一定時間保持する第 2 ステップと、この第 2 ステップの後に、前記作用極に、前記過酸化水素検知電位以上の第 2 の電位を所定時間印加し、その後 10 に零電位以下の第 3 の電位に低下させる第 3 ステップと、この第 3 ステップの後に、前記作用極に、前記第 3 の電位から一定の速度で前記過酸化水素検知電位以上の第 4 の電位まで掃引する第 4 ステップとからなることを特徴とする酵素電極の電圧印加方法。

【請求項 2】 請求項 1 記載の酵素電極の電圧印加方法において、前記第 3 ステップで、前記ステップに代えて、前記作用極に、過酸化水素検知電流よりも高い一定電流を一定時間流し、その後 20 に零電位以下の第 3 の電位に低下させることを特徴とする酵素電極の電圧印加方法。

【請求項 3】 請求項 1 記載の酵素電極の電圧印加方法において、前記第 3 ステップで、前記ステップに代えて、前記作用極に、過酸化水素検知電流よりも高い電流を一定時間流し、しかる後に、直ちにその最終電位を一定時間保持し、その後 30 に零電位以下の第 3 の電位に低下させることを特徴とする酵素電極の電圧印加方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 この発明は、酵素電極の電圧印加方法に関し、特に、過酸化水素型の酵素電極の電圧印加方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 血液中や尿中などのグルコース（ぶどう糖）を検出する手段として、使い捨て方式などの酵素電極が知られている。この種の酵素電極の一種として、作用極と参照極と対極とを有する過酸化水素型の酵素電極があり、その一例が、例えば、特開平 2-129541 号公報に開示されている。このような過酸化水素型の酵素電極では、酵素によって、以下のような反応が発生する。

【0003】 基質（グルコース）＋検体中の酸素 → 基質変換物質＋過酸化水素
この反応式において、過酸化水素の発生量が基質（グルコース）の量に比例するので、発生した過酸化水素を電極で還元させるときの電流値を測定することにより、検体中の基質（グルコース）濃度が求められる。ところで、上記したような反応をそのまま利用する酵素電極で 50

は、以下のような問題があった。すなわち、上記反応式において、検体中の酸素が基質に比べて十分にあれば、酵素電極では基質濃度に応じた電流を発生することになるが、酸素が不足してくると、反応が飽和し、その結果、酵素電極の応答電流が基質濃度に依存しなくなり、基質濃度の検出可能な範囲が、検体中の酸素に依存することになる。

【0004】 このため、酵素電極の検出濃度範囲が、検体中の酸素量によって制限されることになり、例えば、血糖測定においては、必要とされる検出濃度範囲が 500mg/dl 程度であるが、これをかなり下回る範囲までしか測定できない。このような問題に対して、例えば、上記公報に示されている酵素電極では、電極上に滴下する検体量を微量化することにより、検出可能な範囲の拡大を可能にしているが、このような解決手段には、以下に説明する技術的課題があった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 すなわち、上記公報に示されている酵素電極によると、作用極と参照極と対極とを有する電極上に、これらの一部もしくは周囲を圍繞する壁を形成し、この壁内を検体保持領域とすることにより、反応に寄与する検体の微量化を図っているが、このような構成では、検出可能な範囲の拡大ができるにしても、電極の構造が複雑になり、コスト面においても不利になるという問題があった。

【0006】 本発明は、このような従来の問題点に鑑みてなされたものであって、その目的とするところは、電極構造の複雑化を回避しつつ、検出可能な範囲が拡大できる酵素電極の電圧印加方法を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】 上記目的を達成するため、本発明は、作用極と参照極と対極とを有する過酸化水素型の酵素電極に検体を滴下して、前記電極間に電圧を印加する方法において、前記電極に検体が接触したことを検出する第 1 ステップと、この第 1 ステップの後に、前記作用極に電流が流れない第 1 の電位に一定時間保持する第 2 ステップと、この第 2 ステップの後に、前記作用極に、前記過酸化水素検知電位以上の第 2 の電位を所定時間印加し、その後 40 に零電位以下の第 3 の電位に低下させる第 3 ステップと、この第 3 ステップの後に、前記作用極に、前記第 3 の電位から一定の速度で前記過酸化水素検知電位以上の第 4 の電位まで掃引する第 4 ステップとからなることを特徴とする。

【0008】 前記酵素電極の電圧印加方法において、前記第 3 ステップで、上記ステップに代えて、前記作用極に、過酸化水素検知電流よりも高い一定電流を一定時間流し、その後 50 に零電位以下の第 3 の電位に低下させることができる。また、前記酵素電極の電圧印加方法において、前記第 3 ステップで、前記ステップに代えて、前記作用極に、過酸化水素検知電流よりも高い電流を一定時

間流し、しかる後に、直ちにその最終電位を一定時間保持し、その後に零電位以下の第3の電位に低下させることができる。

【0009】

【作用】上記構成の酵素電極の電圧印加方法によれば、特に、作用極に電流が流れない第1の電位に一定時間保持する第2ステップの後に、前記作用極に、過酸化水素検知電位以上の第2の電位を所定時間印加し、その後に零電位以下の第3の電位に低下させる第3ステップと、この第3ステップの後に、前記作用極に、前記第3の電位から一定の速度で前記過酸化水素検知電位以上の第4の電位まで掃引する第4ステップとを設けているので、詳細なメカニズムは不明であるが、後述する実験結果から判るように、検体中の溶存酸素が増加した場合と同等の効果が得られたことから、このような電圧を印加することにより、電気分解により酸素の供給が行われるものと思われる。

【0010】また、請求項2の構成によれば、第3ステップで、作用極に、過酸化水素検知電流よりも高い一定電流を一定時間流し、その後に零電位以下の第3の電位に低下させるので、電極上での酸素の化学反応が一定となり、検体中の基質濃度を測定する際の再現性が向上する。さらに、請求項3の構成によれば、第3ステップで、作用極に、過酸化水素検知電流よりも高い電流を一定時間流し、しかる後に、直ちにその最終電位を一定時間保持し、その後に零電位以下の第3の電位に低下させるので、酸素の供給による基質濃度の測定範囲が拡大するとともに、測定の再現性も向上する。

【0011】

【実施例】以下本発明の好適な実施例について添附図面を参照して詳細に説明する。図1および図2は、本発明にかかる酵素電極の電圧印加方法が適用される酵素電極の一例を示している。同図に示す酵素電極は、使い捨て型のものであって、複数の酵素電極1が連続して設けられていて、各酵素電極1が短手方向に対向形成された切欠部2で個別に分離されるように構成されている。

【0012】各酵素電極1は、絶縁基板3上にエッチングなどにより形成された所定形状の電極部4を有している。この実施例の酵素電極1の電極部4は、基板3のほぼ中心に設けられた参照極4aと、この参照極4aを挟*40

(第1膜7の膜材)

①重合度が500のポリビニルアルコール

.....2. 8mg/ml

②SDS (界面活性剤)

.....2. 5mg/ml

③アルギン酸ナトリウム

.....0. 5mg/ml

④リン酸緩衝剤

.....30mM

リン酸水素2カリウム

.....3. 5mg/ml

リン酸水素1ナトリウム

.....1. 2mg/ml

第2膜8の膜材は、上記第1膜7の膜材に、グルコース
オキシダーゼ (酸化還元型酵素) を5000units

* んでその両側に設けられた第1および第2作用極4b、4cと、作用極4b、4cの側部と一端部とを囲むようにして設けられた対極4dとから構成されている。

【0013】これらの各極4a~4dは、酵素電極1の端部に個別に設けられた外部接続用端子部5にそれぞれ電氣的に接続され、この端子部5には、検体液を滴下して測定を行う際に電流測定器の接触端子が当接され、後述するようなステップで電圧が印加される。そして、対極4dの一部と各極4a~4dと端子部5とを接続する部分上には、これらを覆う略凹形の電気絶縁性の絶縁膜6が設けられている。

【0014】また、上記第1作用極4b上には、これを覆うようにして第1膜7が形成されるとともに、第2作用極4c上には、これを覆うようにして第2膜8が形成されている。さらに、第1および第2膜7、8上には、これらの膜を覆うようにしてオーバーコート膜9が形成されている。第1膜7は、少なくともポリビニルアルコールと界面活性剤とが含まれている。また、第2膜8は、少なくともポリビニルアルコールと界面活性剤と酸素とを含むものである。

【0015】さらに、オーバーコート膜9は、少なくともpH調整剤を含む高分子電解質から形成されるものである。オーバーコート膜9の高分子電解質は、アルギン酸やポリスチレンスルホン酸やポリアクリル酸などが用いられる。また、第1および第2膜7、8に使用する界面活性剤は、SDSの他に、例えば、陰イオン活性剤である高級脂肪酸アルカリ塩系、アルキルアシルスルホン酸塩系、あるいは、非イオン活性剤であるポリエチレングリコールアルキルフェニルエーテル、ソルビタン脂肪酸エステルなどを用いることができる。

【0016】さらに、pH緩衝剤は、リン酸系ものや、2価以上の陽イオンを含まない試薬であって、検体液に溶解したときの水素イオン濃度が5~8の間にあり、酵素反応や電極反応を阻害しないものであればよい。上記第1および第2膜7、8とオーバーコート膜9とのそれぞれの膜材のより具体的な構成と酵素電極1の製造方法の一例を以下に示している。なお、以下の配合比は、蒸留水1ml中の比率で各成分を示している。

【0017】

.....2. 8mg/ml

.....2. 5mg/ml

.....0. 5mg/ml

.....30mM

.....3. 5mg/ml

.....1. 2mg/ml

/ml加えた。

【0018】

(オーバーコート膜 9 の膜材)

- ① アルギン酸ナトリウム (高分子電解質) 10 mg / ml
 ② リン酸緩衝剤 0.6 M
 リン酸緩衝剤の配合モル比
 リン酸水素 2 カリウム : リン酸水素 1 ナトリウム (リン酸 1 ナトリウム)
 2 : 1
 リン酸水素 2 カリウム 116 mg / ml
 リン酸水素 1 ナトリウム 40 mg / ml

以上の配合比の膜材を準備して、第 1 作用極 4 b に第 1 膜 7 用の膜材をディスペンサーで 2 μ l 塗布した後、デシケータ内に収容して 20 分間乾燥した。次に、第 2 作用極 4 c 上に第 2 膜 8 用の膜材を同量塗布し、その後同様な条件で乾燥した。次いで、第 1 および第 2 膜 7, 8 上にオーバーコート膜 9 用の膜材を 8 μ l 塗布し、1 時間以上乾燥した。

【0019】ところで、上述したような酵素電極 1 を含めて、過酸化水素型の酵素電極では、前述したように検体中の溶存酸素量により、基質の検出可能な範囲が制限される。そこで、本発明者らは、過酸化水素型の酵素電極において、電極に印加する電圧の印加方法について検討し、本発明を完成するに至った。図 3 は、本発明にかかる電圧印加方法の第 1 実施例を示している。

【0020】同図に示す電圧印加方法は、第 1 ステップ～第 4 ステップから構成されている。第 1 ステップは、酵素電極 1 に検体が接触したことを検出するステップであって、作用極 4 b, 4 c に正の電位 V_1 を印加し、作用極 4 b, 4 c と対極 4 d との間に流れる電流 I_1 を検知して、検体が酵素電極 1 に接触したことを確認する。

【0021】この場合、作用極 4 b, 4 c に印加する電位 V_1 は、正だけでなく負であってもよいが、電極および酵素膜などに悪影響を及ぼさないために、その大きさはできるだけ小さい値が望ましい。また、電流 I_1 は、電極の状態と検体のしみこむ方向によって正負両電流が流れる可能性があるため、正負両電流の検出が可能な状態に設定することが望ましい。

【0022】第 2 ステップは、前記第 1 ステップの後に、作用極 4 b, 4 c に電流が流れない第 1 の電位に一定時間 t_1 保持するステップである。使い捨て用の酵素電極 1 では、検体を電極部 4 上に滴下点着させた後に、電極部 4 の表面上の酵素反応部において、酵素膜やその他の試薬などと検体とを十分になじませねばならない。このために、検体を検知した後に、一定時間 t_1 だけ電極部 4 に電流を流さない時間帯を設けている。

【0023】電極部 4 に電流が流れない第 1 の電位は、電極部 4 に印加する電位を 0 にすること以外に、例えば、電極部 4 を電位印加手段 (電源装置) から切り離してもよい。また、一定時間 t_1 は、酵素膜の組成や膜厚、電極の構造などによって異なり、概ね 30～40 秒程度に設定されるが、できるだけ薄く、速やかに検体を酵素膜上に誘導できる電極構造や、検体の吸収性の良い

材料を用いることなどにより短縮することができる。

【0024】第 3 ステップは、第 2 ステップの後に、作用極 4 b, 4 c に、過酸化水素検知電位 (図 3 において仮想線で示している) 以上の第 2 の電位 V_2 を所定時間 t_2 印加し、その後に零電位以下の第 3 の電位 V_3 に低下させるステップである。この場合の過酸化水素検知電位は、電極部 4 の構造によっても異なるが、概略 600 mV 程度である。

【0025】第 2 の電位 V_2 の印加時間 t_2 は、第 2 の電位 V_2 の大きさによっても異なるが、測定電流の再現性に悪影響を及ぼさないためにはできるだけ短いほうがよく、望ましくは、10 秒以下に設定することである。また、第 3 の電位 V_3 は、零電位以下であればよいが、例えば、過酸化水素検知電圧が 600 mV であれば、これよりも 800～1000 mV 程度に設定することが望ましい。

【0026】第 4 ステップは、第 3 ステップの後に、作用極 4 b, 4 c に、前記第 3 の電位 V_3 から一定の速度 v_s で前記過酸化水素検知電位以上の第 4 の電位 V_{end} まで掃引するステップである。この場合の速度 v_s は、任意に設定できるが、例えば、100 mV / sec 程度が望ましい。被測定物質の検出は、第 4 の電位 V_{end} まで掃引している点で、電流のピーク値、そのピーク値から一定電位隔たった電位での電流値、特定電位での電流値のいずれかを求め、予め求めておいた検量線から換算する。

【0027】さて、以上のような酵素電極の電圧印加方法によれば、詳細なメカニズムは不明であるが、後述する実験結果から判るように、検体中の溶存酸素が増加した場合と同等の効果が得られたことから、このような電圧を印加することにより、電気分解により酸素の供給が行われ、検体濃度の検出可能領域が拡大するものと思われる。

【0028】図 4 は、本発明にかかる電圧印加方法の第 2 実施例を示しており、上記第 1 実施例と同一もしくは相当する部分の説明を省略し、以下にその特徴部分についてのみ詳述する。同図に示す電圧印加方法は、第 1 実施例と同様に第 1～第 4 ステップから構成されていて、第 1, 第 2, 第 4 ステップは、第 1 実施例と同じである。

【0029】第 3 ステップは、作用極 4 b, 4 c に、予想される最大の過酸化水素検知電流、例えば、測定可能

な最大グルコース濃度を 500 mg/dl とすると、その濃度に対応した過酸化水素酸化電流（具体的には、本実施例では、 $40 \mu\text{A}$ 程度に設定した）よりも高い一定電流 I_2 を一定時間 t_2 流し、その後に零電位以下の第3の電位 V_3 に低下させる。このステップでは、電流制御を行っているので、例えば、参照極 4a と作用極 4b、4c とに同じ素材を用いた場合に適している。参照極 4a の基準電位は、検体中の成分などに依存し、相対的な電位を示す。

【0030】この場合には、同じ電位を印加しても常時同じ電極反応が起こるとは限らない。過酸化水素検知電圧が 600 mV の時もあれば 800 mV になる場合もあつて、例えば、所定の電位を印加する方法では、測定の再現性が低下する。そこで、本実施例では、一定電流 I_2 を一定時間 t_2 流すようにした。このようにすると電極上での化学反応の量が一定になり、電極反応量が制御されるので、測定の再現性が向上する。なお、一定時間 t_2 は、第1実施例と同様な条件で設定される。

【0031】図5は、本発明にかかる電圧印加方法の第* 酵素電極の条件

作用極 4b、4c の幅 w と長さ l
検体

【0035】印加電圧、電流

V_1 : 200 mV
 I_1 : $5 \mu\text{A}$
 t_1 : 20 sec
 V_2 : 1500 mV
 I_2 : $100, 120, 200 \mu\text{A}$
 t_2 : 5 sec
 t_3 : 2 sec
 V_3 : -400 mV
 v_s : 100 mV/sec

【0036】図6は、上記実験条件で、実施例3の状態
で電圧を印加した場合を示している。同図において、①
が図5の電圧印加方法で第3ステップを省略し、第4ス
テップを零電位から掃引した場合である。また、②が図
5の電圧印加方法で第3ステップの V_3 を零電位にした
場合である。さらに、③～⑤が図5の電圧印加方法で第
3ステップの I_2 を $100, 120, 200 \mu\text{A}$ に設定
した場合である。

【0037】図6をみると明らかなように、①の場合が
グルコース濃度が略 180 mg/dl で飽和しているの
に対して、 V_3 を零電位以下にし、かつ、 I_2 を大きく
するに従って、グルコース濃度の飽和値が大きくなり、
測定できる範囲が拡大することが判る。なお、上記実施
例では、酵素電極の一例として、オーバーコート膜が pH
調整剤を含む高分子電解質などで構成したものを例示
したが、本発明の実施はこれに限定されることはなく、

* 3実施例を示しており、上記第1実施例と同一もしくは
相当する部分の説明を省略し、以下にその特徴部分につ
いてのみ詳述する。同図に示す電圧印加方法は、第1実
施例と同様に第1～第4ステップから構成されていて、
第1、第2、第4ステップは、第1実施例と同じであ
る。

【0032】第3ステップは、作用極 4b、4c に、過
酸化水素検知電流よりも高い電流を一定時間流し、しか
る後に、直ちにその最終電位を一定時間 t_3 保持し、そ
の後に零電位以下の第3の電位 V_3 に低下させる。この
ような電圧の印加方法を採用すると、実施例1、2に対
して、若干測定時間が長くなるが、検体濃度の検出可能
な範囲を拡大しつつ、しかも、測定の再現性も向上でき
る。

【0033】図6は、本発明にかかる酵素電極の電圧印
加方法の作用効果を確認するために行った実験の結果を
示したグラフである。この実験では、上述した配合比の
酵素電極を作製し、以下の条件で行った。

【0034】

$w = 0.5 \text{ mm}$, $l = 2.5 \text{ mm}$

EDTA 2 k1.3 mg/ml を添加し、
グルコースを調整した牛血液

他の構成の過酸化水素型酵素電極にも適用することがで
きる。

【0038】

【発明の効果】以上、実施例で詳細に説明したように、
本発明にかかる酵素電極の電圧印加方法によれば、酵素
電極の構造の複雑化を招くことなく、検出可能な範囲を
拡大することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明にかかる電圧印加方法が適用される酵素
電極の一例を示す平面図である。

【図2】図1のA-A線断面図である。

【図3】本発明にかかる電圧印加方法の第1実施例を示
す電圧波形図である。

【図4】本発明にかかる電圧印加方法の第2実施例を示
す電圧波形図である。

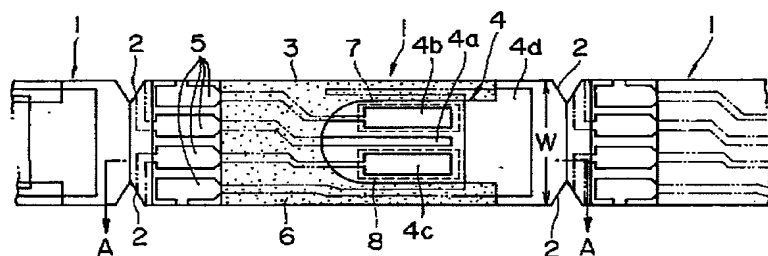
【図5】本発明にかかる電圧印加方法の第3実施例を示
す電圧波形図である。

【図6】本発明の電圧印加方法の作用効果を確認するた
めに行った実験結果を示すグラフである。

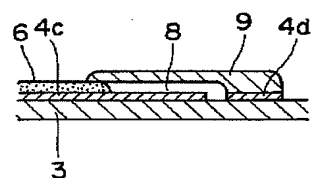
【符号の説明】

1 酵素電極
4 電極部
4a 参照極
4b 作用極
4c 作用極
4d 対極

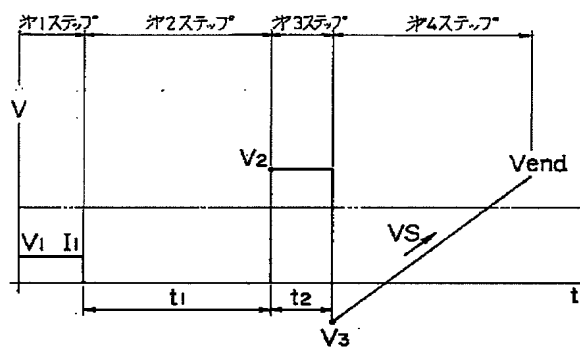
【図1】



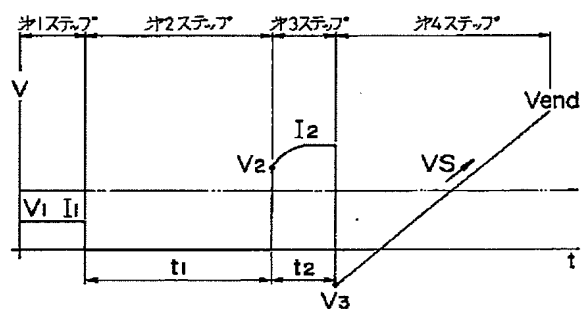
【図2】



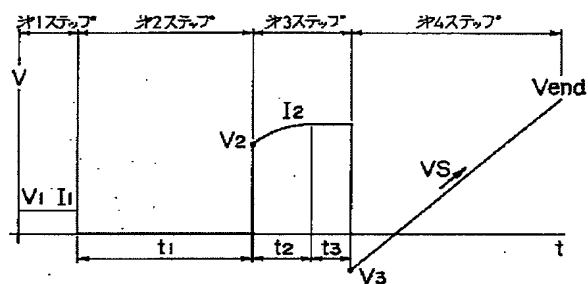
【図3】



【図4】



【図5】



【図6】

